

Nouvelles perspectives biologiques pour le contrôle d'un ravageur très important du cocotier en Indonésie : *Parasa lepida* Cramer, *Limacodidae* par l'utilisation de virus.

C. U. GINTING (1) et R. DESMIER de CHENON (2)

Résumé. — Une maladie sur les chenilles de *Parasa lepida* Cramer, a été trouvée dans le Lampung, Sud Sumatra. Les symptômes externes et internes des chenilles sont donnés. L'incidence naturelle de cette maladie au champ est augmentée par le fait que la contamination est favorisée par le gréganisme de l'espèce. La propagation semble assurée par des diptères qui sont attirés par les chenilles malades, et aussi par la présence d'insectes prédateurs et parasitoïdes. Les symptômes apparaissent à des moments différents selon l'âge des chenilles. Des tests en champs avec traitement par une solution virale de chenilles malades de *P. lepida* donnent, avec succès, une mortalité significative. Cette mortalité est atteinte sur les jeunes chenilles après 4 jours, après 7 jours sur les plus âgées, et après un temps beaucoup plus long de 10 à 15 jours par exemple si l'infestation est faite par recontamination ou apparition naturelle. L'épidémiologie montre que le moment où les chenilles sont vulnérables est la période de mue. Les pathogènes trouvés sont deux virus : *Baculovirus* et petits virus ce qui signifie que cette maladie est une association d'une granulose et d'une infection de petits virus icosaoédriques. Cette maladie donne une nouvelle perspective pour une lutte biologique contre cet important ravageur des cocotiers en Indonésie.

INTRODUCTION

Les effets des virus dans de nombreuses épizooties naturelles chez les insectes sont connus depuis longtemps et les études entreprises sur ces virus ont ouvert des possibilités très intéressantes pour leur emploi en lutte biologique.

Compte tenu des moyens optiques disponibles autrefois, seuls les virus visibles au microscope optique provoquant des polyédroses nucléaires et granuloses ont été tout d'abord utilisés tels, parmi les virus inclus, les *Baculovirus*, dont les virions sont d'une taille de 200 à 400 nm de long pour 40 à 70 nm de large, ou un virus libre le *Baculovirus* de l'*Oryctes*.

Mais la connaissance des très petits virus date seulement d'un peu plus d'une vingtaine d'années grâce à la microscopie électronique.

En 1964, Vago en France [Vago *et al.*, 1964] découvre les densovirus avec les *Densovirus*, virus à ADN, non inclus, parasphériques d'un diamètre de 22 nm. Des virus de ce type ont été par la suite trouvés chez les *Limacodidae* des palmiers en Amérique du Sud : *Sibine fusca* Stoll [Meynadier *et al.*, 1977] ; *Casphalia extranea* Wlk. en Afrique de l'Ouest [Fediere *et al.*, 1981, 1986].

Des particules virales incluses à ARN, d'un diamètre de 35 nm, maintenant regroupées sous le nom de virus β *Nudaurelia*, ont été observées chez *Darna trima* Moore [Syed, 1971 ; Tiong et Munroe, 1977] et chez *Thoesa asigna* van Eecke [Tiong, 1982] au Sabah-Sarawak, Malaisie par Reinganum en 1978 [Reinganum *et al.*, 1978] ; *Setora nitens* Wlk. [Greenwood et Moore, 1982].

Des particules intermédiaires incluses à ARN, icosaoédriques de 30 nm de diamètre, *Picornavirus* ont été détectées chez l'un des plus importants *Limacodidae* du palmier à huile en Afrique de l'Ouest : *Latoia (Parasa) viridissima* Holl. [Fediere *et al.*, 1984].

Avec ces très petits virus, des *Baculovirus*, inclus et de taille plus grande, ont été aussi découverts chez les *Limacodidae*, séparément ou associés : Polyédrose nucléaire chez *Sibine stimulea* Clem. [Van der Geest *et al.*, 1971] et *Natada pucara* Dognin [Genty *et al.*, 1978] en Amérique latine ; granulose chez *Darna trima* Moore [Wood, 1968 ; Thomas et Poinar, 1973] en Malaisie.

Une polyédrose cytoplasmique due à des *Reoviridae*, particules virales incluses icosaoédriques d'un diamètre de 60 à 80 nm, a été aussi mentionnée en Amérique du Sud chez *Sibine apicalis* [Martignoni *et al.*, 1981].

Dans le genre *Parasa*, dans le Sud-Est Asiatique (Fig. 1), nous avons pour la première fois observé une maladie sur *Parasa lepida* Cramer [Desmier de Chenon, 1982]. En 1985, nous avons décelé une forte incidence de cette maladie dans le Lampung, Sud Sumatra.

Nous avons profité de cette opportunité pour effectuer les premières infestations expérimentales en champ, afin d'étudier en détail les symptômes et les caractéristiques des pathogènes et tester le potentiel de cette maladie.

I. — SYMPTOMATOLOGIE DE LA MALADIE

La description des symptômes a été faite sur des chenilles infectées de dernier stade afin de suivre avec plus de précision et plus facilement le développement de la maladie. Sur les chenilles jeunes, le développement des symptômes est comparable mais plus rapide.

(1) Pusat Penelitian Kelapa, Bandar Kuala, P. O. Box 16, Galang, Sumatera Utara (Indonésie)

(2) Consultant IRHO en Indonésie ; c/o IRHO-CIRAD, 11 Square Pétrarque, 75116 Paris (France).

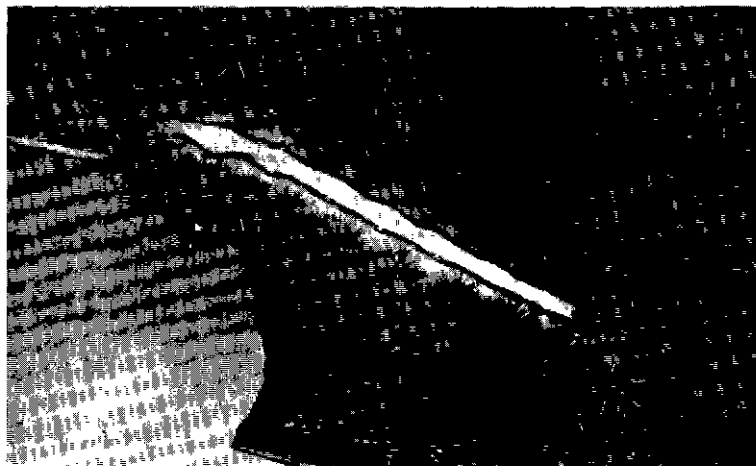


FIG. 1. — Chenille saine de *Parasa lepida* Cr., dernier stade.
(Healthy *Parasa lepida* Cr. caterpillar, last instar).

FIG. 2. — Chenille malade, corps flasque à demi pendante sous la foliole. Perte de coloration. La chenille est déjà morte (phase d). (Diseased caterpillar, flaccid body half hanging off the leaflet. Loss of colour, the caterpillar is already dead-phase d.)

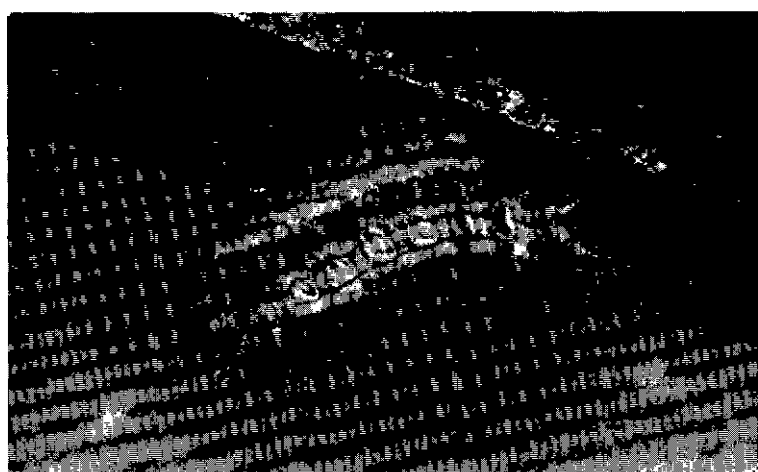


FIG. 3. — Décoloration rougeâtre d'une chenille affectée par la maladie virale (phase f) (Reddish discoloration of a caterpillar infected with the viral disease-phase f.)

FIG. 4. — Deliquescence des tissus, nécrose des téguments et écoulement d'un jus chargé de particules virales (phase g). (Deliquescence of tissue, necrosis of the skin and discharge of a fluid containing viral particles-phase g.)



1. — Symptômes externes.

Les différentes phases de la progression des symptômes sont les suivantes :

a) Le premier symptôme d'une chenille malade est une modification du comportement. La chenille se retire à quelque distance de la bordure où elle s'alimentait, comme elle le fait en cas de mue, quelquefois au milieu de la foliole près de la nervure centrale ou à la base de la foliole près de son insertion sur le rachis.

Il apparaît rapidement que la durée d'immobilisation « repos » est plus longue que la normale pour chaque stade correspondant. En fait, la chenille a cessé de se nourrir et meurt en quelques jours.

b) La chenille commence bientôt à diminuer de longueur et à être plus ramassée sur elle-même qu'une chenille saine au même âge ; mais si elle est plus courte, elle est beaucoup plus large.

L'aspect de la chenille est moins brillant, plus terne avec une légère teinte diffuse jaunâtre laiteuse. Elle est encore vivante mais les coloris de son tégument commencent à passer. La bande bleue dorsale longitudinale devient plus claire et ses lignes de bordure noires disparaissent.

c) En vue latérale, la partie antérieure de la chenille est anormalement renflée. Les tubercules dorsaux commencent à être plus sombres. La partie latéro-ventrale est très gonflée et de couleur jaune blanchâtre plus claire. La bande latérale disparaît aussi.

d) L'aspect des chenilles est plus mou ; souvent, le corps devient déformé. Quelquefois la chenille est à moitié pendante, fixée seulement à la face inférieure de la foliole par la partie postérieure du corps. Cette posture à moitié suspendue est semblable à celle prise par une chenille lorsqu'il fait trop chaud mais, dans le cas présent, la chenille reste définitivement dans cette position.

La partie ventrale de la chenille est si flasque que le tégument est déformé simplement par le poids du corps de la larve. Souvent, et en particulier au dernier stade, beaucoup de chenilles peuvent tomber au sol, mais les jeunes généralement meurent et se dessèchent sur les folioles.

Une importante transformation des organes internes commence en même temps que le début de la déliquescence des tissus. La chenille est déjà morte (Fig. 2).

e) Après ces modifications, l'aspect des chenilles change très rapidement. La partie dorsale est encore jaune et la bande médiane encore visible, mais la coloration est plus sombre. Le corps de la chenille est plus flasque. Latéralement, il est aussi plus sombre et la partie ventrale qui était blanchâtre devient rougeâtre.

f) Très vite, toute la chenille est rougeâtre à brun chocolat rougeâtre, la décoloration commençant à la partie antérieure du corps ; seule l'extrémité de la partie postérieure est encore un peu jaunâtre au début de cette séquence (Fig. 3). La partie ventrale commence à être noirâtre.

g) Au cours de cette dernière modification de la chenille, le corps est complètement rougeâtre — brun chocolat, gonflé et flasque. La partie ventrale est turgescente et de couleur noir brillant.

Avec la déformation de la chenille, il y a écoulement de liquide des parties buccale et anale ce qui indique une altération complète du système digestif et excréteur.

Le tégument ventral qui est aussi maintenant très fragile se déchire souvent et le jus qui s'en écoule est très épais, de couleur brun-jaune sombre avec une odeur nauséabonde (Fig. 4).

h) Les cadavres des chenilles sèchent sur les folioles. Ils sont lentement envahis par des champignons secondaires mais peuvent rester sur le feuillage pendant plusieurs mois, maintenant de cette façon la présence du pathogène.

2. — Symptômes internes.

Les dissections ont été faites sur des chenilles saines de dernier stade afin de les comparer avec celles ayant les tout premiers symptômes (phase b).

a) Quand une **chenille malade** est ouverte, une abondante hémolymphes jaunâtre s'en écoule.

Le système digestif est jaune-vert, l'intestin opaque est à parois épaisses. S'il est coupé, il n'y a pas trace de matière alimentaire. La partie anale du tube digestif est plus claire et transparente.

Les parois internes du corps ont seulement très peu de tissus adipeux.

Les tubes de Malpighi sont très blanchâtres et épais avec à l'intérieur une accumulation d'urates (Fig. 5).

A un stade plus avancé de la maladie, l'intestin est déliquescence.

b) Sur une **chenille saine**, l'hémolymphes est limpide.

A travers le tube digestif, il est possible d'apercevoir l'importante masse brun sombre du contenu alimentaire. Les parois de l'intestin sont donc transparentes et tout le système digestif est plus volumineux.

L'ampoule rectale, avec à l'intérieur toute la matière végétale déjà digérée, est plus brunâtre.

Les parois internes sont pleines de masses de tissu adipeux (Fig. 6).

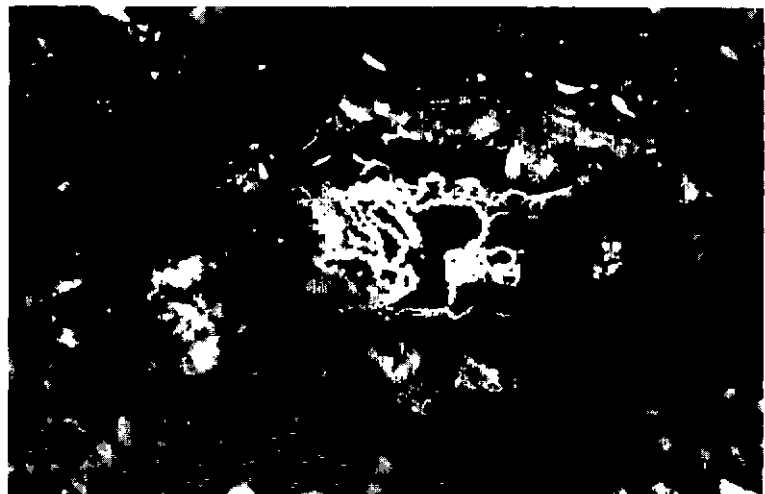


FIG. 5. — Dissection d'une chenille infectée. Hypertrophie de l'intestin et des tubes de Malpighi gonflés d'urates. Transparence des parois du tube digestif qui est vide. La chenille ne s'alimente plus. (Dissection of an infected caterpillar. Hypertrophy of intestine and Malpighian tubes filled with urates. Transparent walls of digestive tube which is empty. The caterpillar has stopped feeding.)



FIG. 6. — Dissection d'une chenille saine. Le système digestif est rempli de matière alimentaire. (Dissection of a healthy caterpillar. The digestive tube is full of food material.)

Naturellement, dans les deux cas de chenilles saines et malades, apparaît immédiatement après la dissection une réaction d'oxydation et les tissus ainsi que l'hémolymph prennent une coloration générale brunâtre.

Remarque. — Plus tard, des observations d'histopathologie seront faites afin d'expliquer ces symptômes externes et internes.



FIG. 7. — Aspect en plantation d'une colonie de *Parasa lepida* Cr. affectée par la maladie virale (Appearance, on a plantation, of a *Parasa lepida* Cr. colony infected by the viral disease).

II. — INCIDENCE NATURELLE DE LA MALADIE

1. — Incidence et évolution de la maladie dans une région affectée par le ravageur.

Sur les feuilles de cocotier dans le Lampung, des jeunes colonies entières de chenilles peuvent être trouvées desséchées et collées sur les folioles.

Quand une colonie de *P. lepida* commence à être infectée, toutes les chenilles de la colonie sont très rapidement contaminées (Fig. 7). Le gréganisme de l'espèce favorise la contamination d'une chenille à une autre. Contrairement à ce qui a été quelquefois écrit pour d'autres espèces, telles que *Sibine fusca* en Amérique du Sud [Genty et Mariau, 1975], les chenilles malades de *P. lepida* ne perdent pas leur instinct grégaire et restent en groupes même lorsqu'elles meurent.

Quand il y a sur une même foliole une colonie infectée et une colonie saine, cette dernière devient très rapidement affectée. A la fin, l'entière population de la palme est contaminée.

Quand une palme nouvellement ouverte, saine, est comparée à une palme plus basse infectée, la population de chenilles sur la nouvelle feuille n'est généralement pas immédiatement affectée bien qu'un inoculum de virus soit présent sur le palmier.

Il est souvent nécessaire d'attendre au moins jusqu'à la fin du développement larvaire afin d'observer quelquefois une colonie affectée.

Si les premiers cas de maladie apparaissent très tardivement, une grande partie des individus de la colonie peuvent se nymphoser mais une grande part mourra à l'intérieur des cocons.

Dans tous les cas, à la génération suivante, toute la population de chenilles du palmier sera affectée.

Ce délai dans l'apparition des infections est dû au fait que, dans une zone où le virus est présent, il y a sans aucun doute sur les palmiers plus bas des cadavres de chenilles tuées par le virus. Ces cadavres restent collés pendant longtemps sur les folioles et favorisent immédiatement le développement de la maladie sur les nouvelles colonies. Mais sur les nouvelles palmiers les colonies récentes qui sont à quelque distance de l'inoculum ont besoin de plus de temps pour être infectées.

Pour la propagation de la maladie, les virus peuvent être

disséminés par le vent. Cependant, ils peuvent aussi être propagés par la pluie et aussi par la faune associée.

Sur les chenilles malades en champ, on a pu noter nombre d'espèces de diptères tels que les *Ceratopogonidae* du genre *Forcipomyia* suçant l'hémolymphe des chenilles infectées. Ces mêmes diptères peuvent être rencontrés sur les chenilles saines ce qui favorise la dissémination de la maladie.

Il peut être observé aussi sur les chenilles mortes des œufs de mouche qui apparaissent en très grand nombre ; ces autres diptères doivent assurer également une large dispersion du virus, tout comme les prédateurs de chenilles tels que les punaises *Pentatomidae*, *Cantharidea* ou *Reduviidae*, et aussi probablement une grande partie des parasites entomophages.

Il est d'ailleurs remarquable d'observer sur un bloc avec présence de virus, que la population de *Parasa lepida* est assez rapidement contrôlée naturellement par la maladie infectieuse.

Note. — Les colonies peuvent être infectées immédiatement après éclosion quand les chenilles sont encore sur le chorion. Elles n'ont alors pris aucune nourriture. Cela peut faire penser, peut-être, que la transmission du virus des adultes jusqu'aux œufs est possible. Les résultats sont donnés dans le tableau I.

2. — Persistance de l'inoculum.

Afin de vérifier les effets, sur les palmes, des chenilles restant *in situ*, tuées par la maladie en octobre 1985, nous avons mis en place 4 mois plus tard, en février 1986, de nouvelles chenilles saines de stade II près des cadavres.

Les chenilles furent transférées d'un cocotier, sans aucune présence de la maladie, à un palmier ayant eu précédemment des colonies infectées (arbre n° 1).

La population d'une colonie n'a pas été mélangée avec la population d'une autre colonie. Les résultats sont donnés dans le tableau II.

Observation. — Après 10 jours, plus de 80 p. 100 de la population initiale a été détruite par la maladie avec un nombre maximal de chenilles affectées après le 7^e et le 8^e jours.

Aussi, durant la même période, deux colonies de chenilles non infectées du même âge furent transférées sur un arbre N° 3 affecté précédemment. Les résultats sont donnés dans le tableau III.

Remarque. — Dans ces deux derniers tableaux, les chenilles « mortes » (*) comprennent aussi quelques chenilles qui ont disparu des feuilles observées mais qui, dans le contrôle, furent notées comme n'ayant pas forcément les symptômes caractéristiques de la maladie.

Observation. — Les chenilles transférées sur l'arbre N° 1 n'ont pas mué régulièrement. Elles avaient montré une séquence anormale d'alimentation et de « repos ».

Mais, par contre, les chenilles sur l'arbre N° 3 sont passées normalement aux stades III et IV.

III. — ESSAIS EXPÉRIMENTAUX EN CHAMP

1. — Préparation de la solution pathogène.

Afin de tester l'efficacité des pathogènes impliqués dans cette maladie de *Parasa lepida*, nous avons ramassé des chenilles mortes avec symptômes typiques.

Ces chenilles furent gardées dans un congélateur à environ — 18 °C pendant quelques jours jusqu'à ce que suffisamment de matériel soit accumulé. Après cela, les chenilles furent écrasées dans un mortier. Une solution fut faite avec un volume de chenilles mortes et deux volumes d'eau distillée.

Le mélange fut filtré avec une mousseline et une solution mère fut obtenue, solution qui fut aussi gardée au congélateur.

2. — Traitement expérimental.

Des chenilles saines furent prises en champ dans notre élevage de *P. lepida* et transférées sur un arbre antérieurement libre de toute chenille.

Après 3 jours, quand les chenilles furent adaptées à leurs nouvelles conditions, elles furent traitées avec une solution de 1 ml de solution mère pour chaque 100 ml d'eau, distribuée à l'aide d'un petit pulvérisateur à main afin de pulvériser seulement une feuille.

Des populations d'âges différents furent testées : colonie de stade III et chenilles de stade VI.

Le traitement fut fait le matin et, chaque soir, les nouvelles chenilles malades avec symptômes bien marqués ainsi que les saines furent recensées. Chaque jour aussi les chenilles mortes furent ramassées.

TABLEAU I. — Incidence de la maladie au cours d'un contrôle dans le Lampung
(Incidence of the disease during a count in Lampung)

Palme/niveau (Fronde/level)	Nomb. de chenilles (Nbr of caterpillars)	saines (healthy)	malades (diseased)	(P. 100)	parasitées (parasited)	(P. 100)	Moyenne attaquée (Average attacked) (P. 100)
F- 9	109	4	3,5	1	0,9	4,4	
9	98	3	3,1	0	0	3,1	
17	348	37	10,6	2	0,6	11,1	
17	290	25	8,6	0	0	8,6	
17	385	50	13,0	0	0	13,0	
25	182	72	39,3	1	0,5	39,9	
25	84	84	100	0	0	100	
Total	1 496	275	16,0	4	0,2	15,7	

TABEAU II. — Evolution de colonies de chenilles sur un arbre (N° 1) précédemment avec colonies infectées
(Evolution of caterpillar colonies on tree N° 1 previously having infected colonies)

Nbre de jours (Nbr. of days)	Nomb. de chenilles (Nbr. of caterpillars)	Stade (Instar) II (1)				Stade (Instar) II (2)			
		saines (healthy)	mortes (dead) (*)	P 100 Mortalité cumulée (Cumulated mortality)	Comportement (Behaviour)	saines (healthy)	mortes (dead) (*)	P. 100 Mortalité cumulée (cumulated mortality)	Comportement (Behaviour)
(17/2/1986)									
1		185	0	0	transfert (transfer)	134	0	0	transfert (transfer)
2		185	0	0	} alimentation (eating)	134	0	0	repos (resting)
3		185	0	0		134	0	0	} alimentation (eating)
4		179	6	3,2	repos (resting) st 3	130	4	3,0	
5		170	9	8,1	alimentation (eating)	124	6	7,4	repos (resting) st 3
6		154	16	16,7	repos (resting)	122	2	8,9	alimentation (eating)
7		108	46	41,6	alimentation (eating)	76	46	43,3	aliment. + repos (eating + resting)
8		66	42	64,3	aliment. + repos (eating + resting)	39	37	70,9	alimentation (eating)
9		36	24	77,3	alimentation (eating)	36	3	73,1	repos (resting)
10		2	31	94,0	repos (resting)	23	13	82,8	alimentation (eating)
11		0	11	100		0	23	100	

TABEAU III. — Evolution de colonies de chenilles sur un arbre (N° 3) sans population précédemment - contrôle
(Evolution of caterpillar colonies on tree N° 3 without previous population - control)

Nbre de jours (Nbr. of days)	Nomb. de chenilles (Nbr. of caterpillars)	Stade (Instar) II (1)				Stade (Instar) II (2)			
		saines (healthy)	mortes (dead) (*)	P 100 Mortalité cumulée (Cumulated mortality)	Comportement (Behaviour)	saines (healthy)	mortes (dead) (*)	P. 100 Mortalité cumulée (cumulated mortality)	Comportement (Behaviour)
(7/2/1986)									
1		137	0	0	transfert (transfer)	86	0	0	transfert (transfer)
2		131	6	4,4	} Alimentation (eating)	85	1	1,2	alimentation (eating)
3		128	3	6,6		81	4	5,8	aliment. + repos (eating + resting)
4		127	1	7,3	} repos (resting)	79	2	8,1	} repos (resting)
5		127	0	7,3		76	3	11,6	
6		123	4	10,2	alimentation (eating)	75	1	12,8	alimentation (eating)
7		123	0	10,2	} repos (resting)	75	0	12,8	} repos (resting)
8		123	0	10,2		74	1	13,9	
9		121	2	11,7	} alimentation (eating)	74	0	13,9	} alimentation (eating)
10		121	0	11,7		73	1	15,1	
11		94	27	31,4	repos (resting)	71	2	17,4	repos (resting)

3. — Résultats.

Après 3 jours environ 80 p. 100 de mortalité sont atteints sur les chenilles de stade III, mais il faut 7 jours pour obtenir les mêmes résultats sur des chenilles plus âgées de stade VI.

Très rapidement, le passage à un taux très élevé de chenilles infectées est obtenu : 20,4 à 77,8 p. 100 pour les jeunes et 23,2 à 85,6 p. 100 pour les plus âgées. Mais cette période de latence dans l'efficacité du pathogène est beaucoup plus courte dans le premier cas que dans le second. Même si deux populations d'âges différents sont mélangées et regroupées en une seule colonie, la mortalité n'est pas la même pour les deux groupes de chenilles.

Mais comme le montre le tableau II, une infestation naturelle en champ, suite à une attaque antérieure de la maladie, prend beaucoup plus de temps. Très probablement, cela est dû au fait que le pathogène n'est pas uniformément dispersé comme cela est le cas avec une pulvérisation. Aussi est-il possible qu'en champ le pathogène, après une longue période, commence à perdre de sa virulence.

Note. — Plusieurs colonies du même âge furent traitées et la plupart d'entre elles montrent une réaction similaire, mais au stade IV-V, le taux de mortalité maximal est atteint le 4^e jour (Tabl. IV).

IV. — ÉPIDÉMIOLOGIE

Après une inoculation artificielle de la maladie, la majeure partie de la population du même âge (60 p. 100) réagit au pathogène au même moment.

Au stade III après 2 jours, les premiers signes de la maladie apparaissent et se traduisent par une modification du comportement. Après 3 jours, il y a nécrose.

Au stade VI, c'est seulement après 6 jours que les premiers symptômes peuvent être vus et il y a nécrose après 7 jours.

Mais en champ, avec réinfestation artificielle sans nouvelle inoculation, la séquence n'est pas si marquée et prend plus de temps (Tabl. V).

Dans le tableau VI il est clair qu'en contamination naturelle, l'apparition de la maladie prend 11 à 12 jours à partir du moment où les œufs sont pondus et éclosent sur un arbre avec présence du pathogène.

Cette période est beaucoup plus longue que dans le cas d'un traitement avec inoculum et une solution pathogène, ou que dans le cas d'une recontamination où les chenilles saines sont placées près des cadavres des chenilles de la génération passée.

Il est aussi clairement montré dans les résultats ci-dessus que les premiers symptômes de la maladie apparaissent pendant la période de « repos » juste avant la mue. A ce moment, il est probable que les chenilles sont beaucoup plus vulnérables.

Dans tous les cas que nous avons suivis, qu'il s'agisse des stades jeune ou âgé, le moment critique est le passage à un nouveau stade, et c'est toujours à ce moment que les symptômes apparaissent.

V. — CARACTÉRISTIQUES DES PATHOGÈNES

Une purification des particules pathogènes fut réalisée par ultra-centrifugation différentielle à partir des broyats de chenilles infectées.

L'examen de la suspension sous microscope électronique montre deux sortes de particules virales [*Publication en préparation* : Desmier de Chenon, Croizier, Biache] :

— des petites particules icosaédriques d'environ 35 nm avec la partie centrale plus claire, probablement *β. Nudarelia* ;

— des gros granules, *Baculovirus*, beaucoup plus allongés que larges, de taille très hétérogène mais en moyenne d'environ 400 nm.

En conséquence, cette maladie de *Parasa lepida* résulte d'une double infection, l'une par un *Baculovirus* responsable d'une granulose et l'autre par un petit virus.

Ces deux virus sont en étude afin de séparer leurs symptômes et de tester séparément leur potentiel ou, peut-être, de voir si leur association est plus efficace pour contrôler les chenilles.

CONCLUSION

Les différentes phases des symptômes de cette maladie virale sur *Parasa lepida* Cramer sont maintenant bien caractérisées.

TABLEAU IV. — Pourcentage de mortalité cumulée après traitement avec solution pathogène
(Percentage of cumulated mortality after treatment with a pathogenic solution)

Nomb. de jours (Nbr. of days)	Nombre de chenilles (Nbr. of caterpillars)	Stade (Instar) III			Stade (Instar) IV		
		saines (healthy)	mortes (dead)	P. 100 Mortalité cumulée (Cumulated mortality)	saines (healthy)	mortes (dead)	P. 100 Mortalité cumulée (Cumulated mortality)
1 Tr		54		0	82		0
2		43	11	20,4	82		0
3		12	31	77,8	79	3	3,7
4		8	4	85,2	77	2	6,1
5		4	4	92,6	71	6	13,4
6		0	4	100	63	8	23,2
7					11	52	86,6
8					3	8	93,3
9					1	2	98,8
10					1	0	98,8
11					1	0	98,8
12					0	1	100

TABLEAU V. — Pourcentage de mortalité jour par jour
(Percentage of mortality day by day)

Nomb. de jours (Nbr. of days)	Inoculation		Réinfestation artificielle (Artificial recontamination)		Contrôle (Control)	
	Stade (Instar) 3 (54)	Stade (Instar) 6 (92)	Stade (Instar) 2 (185)	Stade (Instar) 2 (134)	Stade (Instar) 2 (137)	Stade (Instar) 2 (186)
1 Tr	0	0	0	0	0	0
2	20,4	0	0	0	0	0
3	57,4	3,7	0	0	4,4	1,2
4	7,4	2,4	3,2	3,0	2,2	4,6
5	7,4	7,3	4,9	4,5	0,7	2,3
6	7,4	9,8	8,6	1,5	0	3,5
7		63,4	24,9	34,3	2,9	1,2
8		9,8	22,7	27,6	0	0
9		2,4	13,0	2,2	0	1,2
10		0	16,8	9,7	1,5	0
11		0	5,9	17,2	0	1,2
12		1,2			19,7(*)	2,3
Total	100	100	100	100	31,4	17,5

(*) Une colonie infectée fut placée par inadvertance sur cet arbre près de cette colonie le 8^e jour, et en conséquence cette colonie a commencé à être infectée le 12^e jour.

(*) (An infected colony was inadvertently placed on this tree near this colony on day No. 8 and consequently, this colony began to be infected on day No. 12).

TABLEAU VI. — Evolution détaillée des chenilles de *P. lepida* en contamination naturelle
(Detailed evolution of *P. lepida* of caterpillars under natural contamination)

Date	Comportement (Behaviour)	Nbre d'œufs éclos (Nbre of eggs hatching)	Activité alimentaire (Feeding activity)	Période de repos (Resting period)	Chenilles (Caterpillars)		Stade (Instar)
					malades (Diseased)	disparues (Disappeared)	
27-I -1986		60					I
28-I			60				I
29-I			60				I
30-I				60			I
31-I			59			1	II
1-II-1986			59				II
2-II				58		1	II
3-II				57		1	II
4-II			53			4	III
5-II			53				III
6-II				52		1	III
7-II			50			2	IV
8-II			47			3	IV
9-II			44			3	IV
10-II				42		2	IV
11-II				31	10	1	IV
12-II			1		30		V
13-II			1				V
14-II				1			V
15-II					1		V

En traitements expérimentaux, nous avons montré l'efficacité des pathogènes impliqués sur chenilles jeunes ou âgées.

Des traitements directs avec une solution de chenilles mortes provoquent une forte mortalité après 4 à 7 jours selon les stades mais, avec un inoculum naturel en champ, il faut 12 à 15 jours pour obtenir le même résultat. Par conséquent, une bonne mortalité est obtenue plus rapidement par traitement.

Sur palmiers, avec cadavres de chenilles infestées restants, les virus sont encore actifs après 4 mois, mais au

cours des tests une mortalité significative est obtenue seulement après au moins 9 à 10 jours.

L'épidémiologie de la maladie prouve que quand quelques chenilles sont infectées, très rapidement les chenilles proches de celles-ci sont à leur tour affectées, tout d'abord sur la même feuille et plus tard sur l'ensemble du palmier.

En une génération sur les arbres observés, la maladie s'était suffisamment développée pour prévenir une augmentation de population. Au cours de la génération suivante presque toutes les chenilles avaient disparu.

Les pathogènes trouvés sont un mélange de *Baculovirus*, granulose, et de petits virus associés.

Des études doivent être entreprises afin de mieux connaître cette association et les effets de ces deux virus, séparément ou ensemble.

La spécificité de ces virus doit être connue.

Des tests sur une plus grande échelle doivent être faits en champ et la dose exacte de solution virale déterminée pour arriver à un taux de mortalité significatif.

L'obtention de matériel viral à partir de l'hôte *Parasa lepida* Cramer au niveau d'une plantation est envisageable pour des petits essais.

Naturellement, pour aller plus loin que ces tests en champ afin d'entreprendre des traitements industriels, des tests de pathogénicité sur vertébrés devront nécessairement être faits par des laboratoires très spécialisés.

Aussi, pour une utilisation à plus grande échelle dans le futur et pour d'autres *Limacodidae*, des unités de produc-

tion seront nécessaires afin d'être sûr de la pureté des virus, de vérifier leur identité, assurer leur conservation et les produire en quantités suffisantes.

Mais déjà, nous pouvons considérer que la présence de virus sur *Parasa lepida* ouvre une possibilité d'utilisation intéressante et une nouvelle perspective pour le contrôle biologique de cet important ravageur des cocotiers en Indonésie.

Remerciements. — Nous tenons à remercier l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France : Dr. Croizier, Station de Recherches de Pathologie comparée de Saint-Christol ; Mr. Biache, Station de Recherches de Lutte Biologique de la Minière, pour avoir étudié nos échantillons de chenilles malades, pris les photos de microscopie électronique de ces virus et pour toutes leurs informations.

RÉFÉRENCES

- [1] AMARGIER A., VAGO C., DUTHOIT J. L. et MEYNADIER G. (1979). — Formation tumorale d'origine parvovirale chez *Sibine fusca* Stoll (Lep. Limacodidae) *Entomophaga*, **24**, (3), p. 259-271.
- [2] DESMIER de CHENON R. (1982). — *Latoia (Parasa) lepida* (Cramer) (Lepidoptera Limacodidae), a coconut pest in Indonesia. *Oléagineux*, **37**, N° 4, p. 177-183.
- [3] DESMIER de CHENON R., CROIZIER G. et BIACHE G. (In preparation). Viral disease on a *Lepidoptera Limacodidae* of the genus *Parasa* in Indonesia, *Parasa lepida* Cramer.
- [4] FEDIÈRE G., DESMIER de CHENON R., MARIAU D. et MONSARRAT P. (1981). — Mise en évidence de maladies à epizootie de type denonucleose chez deux chenilles de *Limacodidae* lépidoptères phyllophages du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. *Coll. Internat. Protect. Cult. Trop.* Lyon, France (8-10 juill.), p. 62.
- [5] FEDIÈRE G., MONSARRAT P. and PHILIPPE R. (1984). — Biological control of a limacodid oil palm pest in Ivory Coast by use of a small isometric virus. *1st Reg. Symposium on biological control*. Kuala Lumpur, Malaysia (3-5 september) 5 pp.
- [6] FEDIÈRE G., MONSARRAT P. and MARIAU (P.) (1986). — Biological control of *Casphalia extranea* Wlk (Lepidoptera Limacodidae) defoliator of oil palm and coconut in Ivory Coast by a new *Densovirus*. 2nd Int. Conference on Plant Protection in the tropics (17-20 March), 2 pp.
- [7] GENTY P. and MARIAU D. (1975). — Use of a pathogenic germ in the control of *Sibine fusca* Stoll (Limacodidae) (bilingue fr.-esp.). *Oléagineux*, **30**, N° 8-9, p. 349-354.
- [8] GENTY P., DESMIER de CHENON R. and MORIN J. P. (1978). — Oil palm pests in Latin America (trilingue fr.-angl.-esp.). *Oléagineux*, **33**, N° 7 (Spec. issue), p. 325-419.
- [9] GREENWOOD L. K. and MOORE N. F. (1982). — The *Nudaurelia* β group of small RNA containing viruses of insects. Serological identification of several new isolates. *J. Invertebr. Pathol.*, **39**, p. 407-409.
- [10] MARIAU D., DESMIER de CHENON R. and JULIA J. F. (1981). — Oil palm and coconut pests in West Africa (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, **36**, N° 4 (Spec. Issue), p. 168-228.
- [11] MARTIGNONI M. E. and IWAH P. J. (1981). — A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. In : *Microbial control of pest and plant diseases, 1970-1980*. (H. D. Burges ed.) p. 897-911. Acad. Press, London.
- [12] MEYNADIER G., AMARGIER A. and GENTY P. (1977). — A virus disease of denonucleosis type in the *Lepidoptera Sibine fusca* Stoll (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, **32**, N° 8-9, p. 357-361.
- [13] REINGANUM C., ROBERTSON J. S. and TINSLEY T. W. (1978). — A new group of RNA viruses from insects. *J. gen. Virol.*, **40**, p. 195-202.
- [14] SYED R. A. (1971). — Biological control possibilities of some insect and weed pests in Sabah. *Crop Protection Conf. in Malaysia*, Kuala Lumpur, p. 124-132.
- [15] THOMAS G. M. and POINAR G. O., Jr (1973). — Report of diagnoses of diseased insects, 1962-1972. *Hilgardia*, **42**, p. 261-360.
- [16] TIONG R. H. C. and MUNROE D. D. (1977). — Microbial control of an outbreak of *Darna trima* (Moore) in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Sarawak (Malaysian Borneo). *International Developments in Oil Palm*. Kuala Lumpur, p. 624-639.
- [17] TIONG R. H. D. (1982). — Study of some aspects of biology and control of *Thoesia signa* (Moore). *Proc. Int. Conf. Oil Palm*. Kuala Lumpur (17-20 June 1981), p. 529-542.
- [18] VAGO C., MEYNADIER G. et DUTHOIT J. L. (1964). — Etude d'un nouveau type de maladie à virus chez les Lépidoptères. *Ann. Epiphyties*, **15**, 4, p. 475-479.
- [19] WOOD B. J. (1986). — Pests of oil palm and their control. Kuala Lumpur : Inc. Soc. Pl., 204 pp.

SUMMARY

New biological prospects for controlling a major coconut pest in Indonesia : *Parasa lepida* Cramer, *Limacodidae*, by the use of viruses.

C. U. GINTING, R. DESMIER de CHENON, *Oléagineux*, 1987, 42, N° 3, p. 107-118.

A disease on the caterpillars of *Parasa lepida* Cramer, has been found in Lampung South-Sumatra. The external and internal symptoms on the caterpillars are given. The natural incidence of this disease in the field is increased by the fact that the contamination is favoured by the gregariousness of the species. The propagation seems ensured by *Diptera* which are attracted by the diseased caterpillars and also by the presence of insect predators and parasitoids. The symptoms appear at different times according to the age of the caterpillars. Tests in the field treating with the viral solution of diseased *P. lepida* caterpillars successfully give a significant mortality rate. Death occurs in young caterpillars after 4 days and after 7 days on the old ones, and after a much longer time if infestation is by recontamination or a natural occurrence i.e from 10 to 15 days. The epidemiology shows that the vulnerable stage of the caterpillars is at the time of ecdysis. The pathogens found are two viruses : *Baculovirus* and small viruses, which means that this disease is an association of a granulosis and an infection of small icosahedral viruses. This disease gives new prospects for the biological control of this important coconut pest in Indonesia.

RESUMEN

Nuevas perspectivas biológicas para el control de una plaga muy importante del cocotero en Indonesia : *Parasa lepida* Cramer, *Limacodidae*, mediante la utilización de virus.

C. U. GINTING, R. DESMIER de CHENON, *Oléagineux*, 1987, 42, N° 3, p. 107-118.

En el Lampung, al Sur de Sumatra, se encontró una enfermedad en las larvas de *Parasa lepida* Cramer. Se describen los síntomas externos e internos de las larvas. La incidencia natural de esta enfermedad se halla aumentada por el hecho de que la contaminación queda favorecida por el carácter gregario de la especie. La propagación la realizan al parecer dípteros atraídos hacia las larvas enfermas, y también la presencia de insectos predadores y parasitoides. Los síntomas aparecen en momentos que difieren según la edad de las larvas. Pruebas de campo con tratamiento con solución virótica de larvas enfermas de *P. lepida* muestran una mortalidad significativa, con cierto éxito. Esta mortalidad se logra en un plazo de 4 días en larvas jóvenes, de 7 días en las larvas de más edad, y al cabo de un plazo mucho más largo de 10 a 15 días, por ejemplo, si la infestación se realiza por nueva contaminación o si aparece naturalmente. La epidemiología muestra que el momento en que las larvas son vulnerables es el período de muda. Los agentes patógenos que se encontraron son dos virus : *Baculovirus* y virus pequeños, lo cual significa que esta enfermedad es una asociación de una granulosis y de una infección de pequeños virus icosaédricos. Esta enfermedad abre una nueva perspectiva para el control biológico de esta importante plaga de los cocoteros en Indonesia.

New biological prospects for controlling a major coconut pest in Indonesia : *Parasa lepida* Cramer, *Limacodidae*, by the use of viruses

G. U. GINTING (1), R. DESMIER de CHENON (2)

INTRODUCTION

The effects of viruses in many natural epizootic diseases of insects have been known for a long time and studies carried out on these viruses have opened up many interesting possibilities for their use in biological control.

Due to the optical means available at the time, it was at first only the viruses that were visible under an optical microscope — the occluded DNA *Baculoviruses*, whose virions are 200 to 400 nm long and 40 to 70 nm wide, of nuclear polyhedrosis and granulosis — which were used mostly as well as a non-occluded one, the *Baculovirus* of *Oryctes*.

However, knowledge of the very small viruses only dates back slightly more than 20 years with the use of the electron microscope.

In 1964 Vago in France [Vago *et al.*, 1964] discovered densovirus, *Densovirus* non-occluded para-spherical DNA virus of 22 nm diameter. Viruses of this type were found later on *Limacodidae* on palms in South America : *Sibine fusca* Stoll. [Meynadier *et al.*, 1977] ; *Casphalia extranea* Wlk. in West Africa [Fediere *et al.*, 1981, 1986].

Occluded RNA viral particles of 35 nm diameter now grouped under the name of virus β *Nudaurelia*, were observed on *Darna trima* Moore [Syed, 1971 ; Tiong and Munroe, 1977] and *Thosea asigna* van Eecke [Tiong, 1982] in Sabah - Sarawak, Malaysia by Reinganum in 1978 [Reinganum *et al.*, 1978] ; *Setora nitens* Wlk. [Greenwood and Moore, 1982].

Intermediate icosahedral occluded RNA particles of 30 nm diameter, *Picornavirus* were detected on one of the most important *Limacodidae* on oil palm in West Africa : *Latona (Parasa) viridissima* Holl. [Fediere *et al.*, 1984].

Together with these very small viruses, the bigger occluded *Baculoviruses* have also been found on *Limacodidae* separately or in association with the small ones = nuclear polyhedrosis on *Sibine stimulea* Clem. [Van der Geest *et al.*, 1971] and *Natada pucara* Dognin [Genty *et al.*, 1978] in Latin America ; granulosis on *Darna trima* Moore [Wood, 1968 ; Thomas and Poinar, 1973] in Malaysia.

A cytoplasmic polyhedrosis due to *Reoviridae*, occluded RNA viral icosahedral particles of 60 to 80 nm diameter has also been mentioned in South America on *Sibine apicalis* [Martignoni *et al.*, 1981].

On the genus *Parasa* in South East Asia (Fig. 1), a disease was detected for the first time on *Parasa lepida* Cramer [Desmier de Chenon, 1982]. In 1985 we again detected a high incidence of this disease in Lampung, South Sumatra.

We took this opportunity to start an experimental infestation of *Parasa lepida* in the field, in order to study in detail the symptoms and the characteristics of the pathogens and to test the potential of this disease.

I. — SYMPTOMATOLOGY OF THE DISEASE

The description of the symptoms is based on infected caterpillars of the last instars in order to follow the development of the disease more accurately and more easily. On young caterpillars the symptom development stages are similar but faster.

(1) Pusat Penelitian Kelapa, Bandar Kuala, P. O. Box 16, Galang, Sumatera Utara (Indonesia)

(2) IRHO Consultant in Indonesia ; c/o IRHO-CIRAD, 11, square Pétrarque 75116 Paris (France).

1. — External symptoms.

The different phases of the progression of symptoms are as follows :

a) The first symptom of a diseased caterpillar is a modification of its behaviour. The caterpillar withdraws some distance from the feeding edge in the same manner as when it wants to moult, sometimes to the middle of the leaflet near the mid-rib or at the base near the insertion in the rachis.

It can be quickly seen that the duration of the rest period is much longer than normal for each corresponding instar. In fact the caterpillar has completely stopped eating and within a few days will die.

b) The caterpillar soon begins to shrink in length and be shorter than a healthy one of the same age, but much wider. The appearance of the caterpillar is less bright, duller with a slightly diffuse yellowish — milky tint. The larva is still alive but the pattern on its skin begins to fade. The dorsal blue longitudinal band becomes lighter, and its back border lines disappear.

c) From a lateral view the anterior part of the caterpillar is swollen. The dorsal tubercles start to become darker. The latero-ventral part is very puffed and a clearer whitish yellow in colour. The lateral band also disappears.

d) The appearance of the caterpillars is softer ; often the body becomes distorted. Sometimes the caterpillar is half hanging fixed only to the underside of the leaflet by the posterior part of the body. This is in the manner of a caterpillar hanging when it is too hot, but in this case the caterpillar stays in this position permanently.

The ventral part of the caterpillar is so flaccid that the skin is deformed merely by the weight of the larva's body. Often, and especially at the last instar many caterpillars can fall on to the soil, but the young ones generally die and dry up on the leaflets.

A significant transformation of the internal organs starts at the beginning of tissue deliquescence. The caterpillar is already dead (Fig. 2).

e) After these modifications, the appearance of the caterpillar changes very quickly. The dorsal part is still yellow and the middle band can be seen, but the colour is darker. The body of the larva is more flaccid. Laterally, the larva is also darker and the ventral part which was whitish becomes more reddish.

f) Very soon the whole caterpillar is reddish to reddish-chocolate brown, with the discoloration starting from the front part of the body, only the extremity of the posterior part is still slightly yellowish at the beginning of the sequence (Fig. 3). The ventral part starts to become blackish.

g) In this last modification of the caterpillar, the body is completely reddish-chocolate brown, swollen and flaccid. The ventral part is turgid and shiny black.

The distortion of the larva is accompanied by a discharge of liquid from the buccal and anal parts which indicates a complete alteration of the digestive and excretory systems.

The ventral skin which is now also very fragile often breaks open and the fluid flowing out is very thick and dark yellowish brown in colour with a foul smell (Fig. 4).

h) The dead bodies of the caterpillars dry on the leaflets. The remains are slowly invaded by secondary fungi but can stay on the foliage for several months maintaining in this way the presence of the pathogen.

2. — Internal symptoms.

Dissections were made on healthy caterpillars in the last instar in order to compare them with those having the early symptoms (phase b).

a) When a diseased caterpillar is opened, an abundant yellowish hemolymph flows out of the body cavity.

The digestive system is greenish yellow, the intestine opaque and thick-walled which, if cut, has no trace of alimentary matter. The anal part of the digestive tube is clearer and transparent.

The internal walls of the body have only very few traces of fatty tissues.

The Malpighian tubes are very whitish and thick with an accumulation of urates inside.

At a more advanced stage of the disease the intestine is deliquescent (Fig. 5).

b) In a healthy caterpillar the hemolymph is limpid. Through the digestive tube it is possible to see the considerable mass of dark brown alimentary contents. Therefore the walls of intestine are transparent and the whole digestive system is greater in volume.

The rectal bulb containing digested plant material is more brownish.

The internal walls are filled with masses of fatty tissue (Fig. 6).

Of course, in both cases of healthy and diseased caterpillars, immediately after dissection an oxidation reaction occurs and the tissues and hemolymph take on a generally brownish colour.

Note. — Later on, histopathological observations will be made in order to explain these external and internal symptoms.

II. — NATURAL INCIDENCE OF THE DISEASE

1. — Incidence and evolution of the disease in a pest affected area.

On coconut palm leaves in Lampung, complete young colonies can be found dried and stuck to the leaflets.

When a colony of *P. lepida* begins to be infected, all the caterpillars of the colony are very quickly contaminated (Fig. 7). The gregariousness of the species favours contamination from one caterpillar to the next. Contrary to what has sometimes been written for other species like *Sibine fusca* in South America [Genty and Mariau, 1975], the diseased caterpillars of *P. lepida* do not lose their gregarious instinct and remain in groups even when dying.

When there is an infected colony together with another healthy colony on the same leaflet, the latter becomes affected very quickly. Ultimately, the whole population of the frond is affected.

When a healthy, newly opened frond is compared with an infected lower frond, the population of caterpillars on the new leaf is generally not immediately affected although the virus inoculum is present on the palm tree. It is often necessary to wait at least until the end of larval development to see sometimes an affected colony.

If the first cases of the disease occur very late, many of the individuals in the colony are able to pupate but a large part will die inside their cocoons.

In all cases, with the following generation, the whole population on the palm will be affected.

This difference in the timing of the infections is because, in an area where the virus is present, there are undoubtedly on the lower fronds, corpses of caterpillars killed by the virus. These corpses remain stuck on the leaflets for a long time and immediately favour the development of the disease on new colonies. However, on the new fronds the recent colonies which are at some distance from the inoculum take more time to be infected.

For the propagation of the disease the viruses can be spread by the wind. However, they can also be propagated by the rain and especially by the associated fauna.

On the diseased caterpillars in the field many species of *Diptera* can be noted such as *Ceratopogonidae* of the genus *Forcipomyia* sucking the hemolymph of the infected caterpillars. They can be found also on healthy ones and this favours the dissemination of the disease.

It can also be observed that on the dead caterpillars, eggs of different flies occur in a very great numbers, the adults of which must ensure a wide dispersion of the virus, as do also the predators of caterpillars such as the bugs *Pentatomidae*, *Canthaconidea* or *Reduviidae* and also probably a great part of the entomophagous parasites.

It is moreover remarkable to observe on a plot with the virus, that the population of *Parasa lepida* is quite quickly controlled naturally by the infectious disease.

Note. — The colonies can be infected immediately after hatching when the caterpillars are still on the chorion. Thus they have not yet taken any food. This suggests that the transmission of the virus from the adults to the eggs may be possible (Table I).

2. — Persistence of the inoculum.

In order to check the effects on the fronds from the remaining caterpillars killed by the disease in October 1985, we placed new healthy caterpillars of instar II near dead bodies four months later in February 1986.

The caterpillars were transferred from a coconut palm without any presence of the disease to a palm previously having infected colonies (Tree N° 1).

The population of one colony was not mixed with the population of the other colony. Results are given in table II.

Observation. — After 10 days more than 80 p. 100 of the initial population was destroyed by the disease with a maximum number of caterpillars being affected after the 7th and 8th days.

Also during the same period two uninfected colonies of the same age were transferred to tree N° 3, previously affected (Table III).

Note. — In these two tables (II, III), the dead caterpillars (*) also include some caterpillars which disappeared but in the control were not necessarily found to have the characteristic symptoms of the disease.

Observation. — The caterpillars transferred to tree N° 1 did not moult regularly. They showed an abnormal eating and resting sequence.

On the other hand the caterpillars on tree N° 3 progressed normally to instars III and IV.

III. — EXPERIMENTAL TRIALS IN THE FIELD

1. — Preparation of the pathogenic solution.

In order to test the effectiveness of the pathogens involved in this *Parasa lepida* disease, we collected dead caterpillars with typical symptoms.

These caterpillars were kept in a freezer at about -18°C for some days until enough material was accumulated. After this, larvae were crushed in a mortar. A solution was made with one volume of dead larvae and two volumes of distilled water. The mixture was filtered through a muslin cloth and a master solution was obtained which was also kept in the freezer.

2. — Experimental treatment.

Healthy caterpillars were taken in the field in our rearing population of *Parasa lepida* and transferred to a tree previously free of caterpillars.

After 3 days when the caterpillars were adapted to their new conditions, they were treated with a solution of 1 ml of master solution to every 100 ml water, dispensed from a small hand sprayer in order to spray only one frond.

Populations of a different age were tested : colony of instar III and caterpillars of instar VI.

The treatment was given in the morning and every evening the number of new diseased caterpillars with advanced symptoms along with the healthy ones were counted. Each day these dead caterpillars were collected.

3. — Results.

After 3 days, about 80 p. 100 mortality is reached on caterpillars of instar III, but it took 7 days to achieve the same results on older caterpillars of instar VI.

Very soon, a very large number of caterpillars are infected 20.4 to 77.8 p. 100 of the young ones and 23.2 to 86.6 p. 100 of the old ones. But this latent period for the effectiveness of the pathogen is much faster in the first case than in the second.

Even if two populations of different ages are mixed and regrouped into one colony, mortality is not the same for the two kinds of caterpillars.

But, as was shown in the Table II, isolated natural infection in the field following a previous attack of the disease takes a much longer time. This is probably due to the fact that the pathogen is not uniformly distributed as it was when sprayed. It is also possible that, in the field, the pathogen begins to lose its potency after a long period.

Note. — Several colonies of the same age were treated and most of them showed a similar reaction ; but at instar IV-V, the maximum mortality rate is reached on the 4th day (Table IV).

IV. — EPIDEMIOLOGY

After artificial inoculation of the disease, the majority of the population of the same age (about 60 p. 100) reacts to the pathogen at the same time.

On instar III after 2 days, the first signs of the disease appear with modification of the behaviour and, after 3 days, necrosis.

On instar VI, it is only after 6 days that the first symptoms can be seen and the necrosis after 7 days.

But in the field, with artificial reinfestation, the sequence is not so marked and takes more time (Table V).

It is clearly seen from this table VI that under natural contamination, the appearance of the disease takes about 11 to 12 days from the moment the eggs are laid on a tree where the pathogen is present. This period is much longer than in the case of inoculum treatment with a pathogenic solution or in the case of

recontamination whereby the healthy caterpillars are placed near the dead bodies of the past generation.

It is also clearly shown that the initial symptoms of the disease occur during the resting period just before moulting. The caterpillars are probably much more vulnerable at this time.

In all the cases we have followed, whether on young or old instars, the crucial moment is the passage into a new instar and it is always at this moment that the symptoms appear.

V. — CHARACTERISTICS OF THE PATHOGENS

A purification of the pathogenic particles was carried out by differential ultra centrifugation from the ground infected caterpillars.

Examination of the suspension under the electron microscope shows two kinds of viral particles (Publication under preparation : Desmier de Chenon, Croizier, Biache) :

— small icosahedral particles of about 35 nm with clear centres, probably β *Nudaurelia* ;

— very large granules, *Baculovirus*, much more elongated than wide, very heterogenous in size of about 400 nm long in average.

Consequently, this disease of *Parasa lepida* results from a double infection : one a *Baculovirus* responsible for granulosis and the other by a small virus.

These two viruses are under investigation in order to separate their symptoms and to test their potential separately or maybe to see if their association is more effective in controlling caterpillars.

CONCLUSION

The different phases of the symptoms of this viral disease on *Parasa lepida* Cramer are now well characterized.

In experimental treatments we have demonstrated the effectiveness of the pathogens involved on young and old caterpillars.

Direct treatment with a solution of dead caterpillars provokes high mortality after 4 to 7 days depending on the instars but with a natural inoculum, in the field, a similar result requires 12 to 15 days. Therefore this mortality is obtained more quickly with treatment.

On palms with remaining infected caterpillars bodies the viruses are still active after 4 months, but in tests significant mortality is obtained after only 9 to 10 days at least.

The epidemiology of the disease proves that when some caterpillars are infected, the individuals around them are very soon affected by the disease in turn, first on the same frond and later on the whole tree.

In one generation on the trees observed, the disease had developed enough to prevent an increase of population. In the next generation nearly all the caterpillars had disappeared.

The pathogens found are a mixture of *Baculovirus* granulosis and small associated viruses.

Studies should be carried out to discover more about this association and the effects of the two viruses, separately or together.

The specificity of these viruses must be known.

Tests on a larger scale should be carried out in the field and the right rate of viral solution determined in order to achieve a significant mortality rate.

Obtaining viral material from the host *Parasa lepida* Cramer at plantation level can be considered for small trials.

Of course, in order to go further than these tests in the field and in order to carry out industrial treatment, tests of pathogenicity on vertebrates will have to be carried out by very specialized laboratories.

Also, on a larger scale in the future, and for other *Limacodidae*, production units will be necessary in order to ensure the purity of the virus, verify their identity, assure their conservation and produce them in sufficient quantities.

But already we can consider that the presence of viruses on *Parasa lepida* opens up possibilities for interesting utilization and new prospects in the biological control of this serious coconut pest in Indonesia.

Acknowledgements. — We should like to thank the National Institute for Agronomical Research (INRA), France : Dr Croizier, Saint Christol Compared Pathology Research Station and Mr Biache, La Mmière Biological Control Research Station for studying our samples of diseased caterpillars, taken electron microscopy pictures of the viruses and for their information. ■